

核受体 Nur77 调节转化生长因子 TGF- β 信号活性的探究

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 32320121153077

UDC _____

厦门大学

硕士学位论文

核受体 Nur77 调节转化生长因子 TGF- β 信号活性的探究

The Regulation of Transforming Growth
Factor β Signaling Activity by Nuclear
Receptor Nur77

林佳城

指导教师姓名: 周 虎 教授

张晓坤 教授

专业名称: 化学生物学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

目 录

目 录.....	I
Table of Content.....	VI
英文缩略词	1
摘 要.....	3
Abstract.....	5
1. 前 言.....	7
1.1 核受体概述.....	7
1.2 孤儿核受体 Nur77	8
1.3 转化生长因子 TGF- β 信号通路概述	12
1.4 核受体与 TGF- β 信号通路的交互作用	17
2. 材料与方法	20
2.1 实验材料.....	20
2.2 实验方法.....	23
2.2.1 细胞培养相关.....	23
2.2.2 细胞转染.....	23
2.2.3 细胞裂解与 Western-blot.....	24
2.2.4 免疫荧光染色（Immunofluorescence）	26
2.2.5 免疫共沉淀实验（Co-Immunoprecipitation）	27
2.2.6 报告基因检测.....	28
2.2.7 RNA 提取与实时荧光定量 PCR（RT-PCR）	29
2.2.8 染色质免疫共沉淀实验（Chromatin-Immunoprecipitation）	29
3. 结果与分析	33
3.1 Nur77 激活 TGF- β 信号通路.....	33
3.1.1 Nur77 对 CAGA-luc 报告基因的激活作用.....	33
3.1.2 Nur77 激活 CAGA-luc 的浓度依赖性.....	34

3.1.3 Nur77 激活 CAGA-luc 报告基因的特异性.....	35
3.1.4 干扰 Nur77 使 TGF- β 信号通路的激活下降	37
3.1.5 T β RI 抑制剂抑制 Nur77 对 CAGA 报告基因的激活	38
3.2 Nur77 激活 TGF- β 信号通路的机制研究.....	39
3.2.1 Nur77 与 Smad3 的相互作用	39
3.2.2 Nur77 通过 Smad3 结合到 Smad3 的靶基因上	46
3.2.3 Nur77 调控 TGF- β /Smad3 信号的其他可能方式	47
3.3 Nur77 对 TGF- β 信号通路靶基因的调节.....	54
3.3.1 Nur77 调节 TGF- β 信号通路靶基因的 mRNA 水平	54
3.3.2 Nur77 调节 TGF- β 信号通路靶基因的蛋白表达水平	55
4. 讨 论.....	56
5. 结 论.....	60
参考文献	61
致 谢.....	69

Table of Content

Table of Content in Chinese	I
Table of Content	VI
List of Abbreviation	1
Abstract in Chinese.....	3
Abstract.....	5
1 Introduction.....	7
Section I Review of Nuclear Receptor	7
Section II Orphan Nuclear Receptor Nur77.....	8
Section III Review of TGF- β signaling pathway.....	12
Section IV New researches between NRs and TGF- β signaling pathway ..	18
2 Materials and Methods.....	21
2.1 Experimental Materials.....	21
2.2 Experimental Methods	24
2.2.1 Cell culture.....	错误!未定义书签。
2.2.2 Cell Transfection	错误!未定义书签。
2.2.3 Western-blot.....	错误!未定义书签。
2.2.4 Immunofluorescence	错误!未定义书签。
2.2.5 Co-Immunoprecipitation	错误!未定义书签。
2.2.6 Reporter Assay	29
2.2.7 RNA extraction and RT-PCR.....	29
2.2.8 Chromatin-Immunoprecipitation	错误!未定义书签。
3 Results and Analysis	34
3.1 Nur77 activates TGF- β signaling pathway	错误!未定义书签。
3.1.1 Nur77 activates CAGA-luc reporter.....	错误!未定义书签。

3.1.2 The activation of CAGA-luc is depend on Nur77 concentration . 错误!未定义书签。	
3.1.3 Nur77 can't bind the CAGA-luc plasmid..... 错误!未定义书签。	
3.1.4 Nur77 knock-down reduce the TGF- β signaling activation 错误!未定义书签。	
8	
3.1.5 T β RI inhibitor can decrease the activation brought by Nur7739	39
3.2 The mechanism of Nur77 activating TGF- β /Smad3 ..错误!未定义书签。	
3.2.1 Interaction between Nur77 and Smad3..... 错误!未定义书签。	
3.2.2 Nur77 bind to Smad3 target genes depend on Smad3 错误!未定义书签。	
3.2.3 The other way of Nur77 regulates TGF- β /Smad348	48
3.3 Nur77 regulates the TGF- β signaling responsive genes 错误!未定义书签。	
3.3.1 Nur77 regulates mRNA of TGF- β signaling responsive genes. 错误!未定义书签。	
3.3.2 Nur77 regulates expression of TGF- β signaling responsive genes 错误!未定义书签。	
4 Discussion.....57	57
5 Conclusion..... 61	61
Reference62	62
Acknowledgement69	69

英文缩略词

英文缩写	英文全称	中文名称
AF1	Activation Function1	转录激活功能域 1
AF2	Activation Function2	转录激活功能域 2
AR	Androgen Receptor	雄性激素受体
ATCC	American Type Culture Collection	美国模式培养物研究所
BMP	Bone Morphogenetic Protein	骨形态发生蛋白
CDK	Cyclin-Dependent Kinase	细胞周期蛋白依赖性激酶
Ch-IP	Chromatin Immunoprecipitation	染色质免疫共沉淀
CHX	Cycloheximide	放线菌酮
COUP-TF	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor	鸡卵清蛋白上游启动子转录因子
DBD	DNA-Binding Domain	DNA 结合结构域
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	改良 Eagle's 培养基
ER	Estrogen Receptor	雌性激素受体
GR	Glucocorticoid Receptor	糖皮质激素受体
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1	低氧诱导因子
LBD	Ligand-Binding Domain	配体结合结构域
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	丝裂原激活的蛋白激酶
MH1	Mad Homologue 1	Mad 同源结构域 1
MH2	Mad Homologue 2	Mad 同源结构域 2
MR	Mineralocorticoid Receptor	盐皮质激素受体
NES	Nuclear Export Signal	出核信号
NGFI-B	Nerve Growth Factor-Induced Gene B	神经生长因子诱导基因 B
NLS	Nuclear Localization Sequence	核定位序列

NR	Nuclear Receptor	核受体
NBRE	NGFI-B Responsive Element	NGFI-B 反应原件
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1	纤溶酶原激活抑制物 1
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor	过氧化物酶体增植物激活受体
PR	Progesterone Receptor	孕激素受体
RAR	Retinoic Acid Receptor	视黄酸受体
RXR	Retinoid X Receptor	类视黄醇 X 受体
SARA	SMAD anchor for receptor activation	Smad 受体锚定蛋白
TGF- β	Transforming Growth Factor β	转化生长因子 β
TIMP1	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloprotease-1	基质金属蛋白酶组织抑制剂 1
TR	Thyroid Hormone Receptor	甲状腺激素受体
T β R I	TGF- β Receptor I	TGF- β I 型受体
T β R II	TGF- β Receptor II	TGF- β II 型受体
VDR	Vitamin D Receptor	维他命 D3 受体

摘要

孤儿核受体 Nur77 是核受体 (Nuclear Receptors, NRs) 超家族中非常重要的一员。它作为细胞内立早基因的产物,能够响应包括各类生长因子在内的多种刺激。同时, Nur77 广泛参与到机体的生理以及病理学过程中,如:糖脂代谢,细胞自噬,炎症发生发展以及肿瘤的生长凋亡等过程。转化生长因子 (Transforming Growth Factor β , TGF- β) 信号通路在体内广泛参与包括糖代谢,脂质代谢,胞外基质的更替,细胞的增殖、分化,组织的纤维化以及肿瘤的发生发展等多种生理以及病理过程的调控。对 TGF- β 信号通路调控的研究一直是 TGF- β 研究的重点,但是核受体对 TGF- β 信号调节的活性和机理尚不清楚。

本课题在探究核受体与 TGF- β 之间相互关系的过程中,发现了 Nur77 能够作为一种新的调控蛋白对 TGF- β 信号通路进行调控,并揭示了其中的调控机制。我们首先通过报告基因发现并证明了 Nur77 能够在 HepG2 细胞中激活 TGF- β /Smad3 信号通路。研究发现,在所用检测的核受体中,只有 Nur77 能够显著激活响应 TGF- β /Smad3 的报告基因 CAGA-luc。实验中发现 Nur77 不仅能够上调本底 CAGA-luc 的报告基因活性,还能对 TGF- β 信号带来的激活有上调作用。同时, Nur77 带来的这种激活效应能够被 TGF- β 一型受体抑制剂 SB431542 部分抑制。

我们进一步探究 Nur77 上调 TGF- β /Smad3 活性的生物学机制。我们通过免疫共沉淀的方法发现, Nur77 能够和 Smad3 有相互作用,其相互作用的结构域为 Nur77 的 AB 区域和 Smad3 的 MH2 结构域。通过染色质免疫共沉淀实验揭示 Nur77 能够通过结合 Smad3 间接结合 Smad3 的响应原件。因此 Nur77 通过其自身的转录自激活活性,并通过与 Smad3 结合,进而激活 Smad3 靶基因的转录。另外我们发现 Nur77 可能还通过其他方式激活 Smad3 信号。Nur77 能够延长 Smad3 的磷酸化和细胞核内滞留时间,进而延长 Smad3 的激活时间;另外, Nur77 与 Smad3 之间的相互作用能够破坏 Smad3 与 Smad6 之间的相互作用,进而降低了 Smad6 对 Smad3 激活的抑制作用。通过 RT-PCR 和免疫印迹实验,我们发现 Nur77 能够上调 TGF- β 所诱导的 PAI-1 等 Smad3 靶基因的表达。

因此,本研究发现了一种 TGF- β 信号通路的新的调节蛋白-孤儿核受体 Nur77,

并揭示了 Nur77 调节 TGF- β /Smad3 信号通路新的作用机制。本研究为治疗 TGF- β 信号通路紊乱所导致的疾病提供了一种潜在的治疗方式。同时,本研究也拓展了 Nur77 所能参与的细胞信号转导网络,以及 Nur77 所能够调控的生物学功能。

关键词: 核受体; Nur77; TGF- β ; Smad; 信号调控

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Nur77 is a unique member of nuclear receptor superfamily. As a product of immediate early responsive gene, it responds to a variety of stimuli, including various growth factors. Nur77 participates widely in physiological and pathological processes, such as glycolipids metabolism, autophagy, inflammation, and growth and apoptosis of tumor. Transforming growth factor β (TGF- β) signaling pathway broadly participates in regulating a wide range of physiological and pathological processes, including glucose metabolism, lipid metabolism, extracellular matrix replacement, cell proliferation and differentiation, tissue fibrosis, and tumor development. Exploration of the regulation of TGF- β signaling has been attracting great interests for many years. A number of reports have revealed the regulations of TGF- β signaling pathway by nuclear receptors. However, the detailed interactions and the underlying mechanisms between nuclear receptors and TGF- β signaling are largely unknown.

In the exploration of the regulation of TGF- β signaling by some nuclear receptors, we found that Nur77 could regulate TGF- β signaling with the specific mechanisms. Nur77 up-regulated both the basal and TGF- β -stimulated Smad3 activity in HepG2 liver cancer cells, indicated by our luciferase reporter gene assays using CAGA-luc reporter. The specific effects of Nur77 on TGF- β signaling pathway was further confirmed by our results showing the dose-dependent up-regulation of TGF- β signaling by Nur77, no regulation of the reporter gene without CAGA sequence by Nur77, and the inhibition of Nur77 effect by TGF- β receptor I's inhibitor SB431542.

We further investigated the underlying mechanism of the Nur77-mediated up-regulation of TGF- β signaling. We found that Nur77 and Smad3 interacted with each other using co-immunoprecipitation assay. Furthermore, the interaction domains were mapped at the AB region of Nur77 and the MH2 domain of Smad3. The result revealed by our chromatin immunoprecipitation assay showed that Nur77 could indirectly bind to the Smad3 responsive DNA elements through its interaction with

Smad3. Therefore, we suggested that Nur77 activated TGF- β /Smad3 signaling by its auto-transactivation activity following its Smad3-mediated binding to Smad3 responsive DNA elements. In addition, we found other possible mechanisms by which Nur77 activated TGF- β /Smad3 signaling. Nur77 was able to stabilize Smad3 phosphorylation and nuclear localization, thereby extending the activating duration of Smad3. In addition, Nur77 released the inhibition of Smad3 activity by Smad6 via disrupting the interaction between Smad3 and Smad6. To confirm the up-regulation of TGF- β signaling by Nur77, we examined the expressions of Smad3-targeted genes. We found that Nur77 could significantly increase the expression of TGF- β -induced PAI-1 and other Smad3-targeted genes by using RT-PCR and western blot assays.

Together, our study revealed a novel modulator of TGF- β signaling pathway - Nur77, and demonstrated the underlying mechanism of the modulation of TGF- β by Nur77. Our study also provided a possible treatment for TGF- β signaling-related disease by targeting Nur77, and broadened our understanding of the biological functions of Nur77.

Keywords: Nuclear Receptor; Nur77 ; TGF- β ; Smad; Signal Regulation.

1. 前言

1.1 核受体概述

核受体家族是一类转录因子，它们可以直接与配体结合。核受体的成员一共有 48 个，其中包括：RXR、RAR、ER、AR、PPAR 等。经典概念来讲，它们当中大部分能够通过结合内源性配体或者药物分子来调节其作用方式或下游基因的表达情况。近年来，核受体受到广泛的关注，一方面是因为他们作为药物靶点的特性，另一方面是因为发现他们与多种疾病的发生发展有紧密关系，例如核受体在癌症，糖尿病，脂肪肝的发生中都起到重要作用。核受体被特异性的内源或外源的小分子结合后，可以引起多种生物学效应，从而影响代谢、免疫、生长、死亡、发育和分化等很多生理过程。其作用机理是核受体在小分子结合后能够引起对特定下游靶基因的转录激活的调节诱导，进而引起生理学水平的影响。因为核受体的调节失常与很多病理过程相关，很多药物的开发靶点是核受体，这些药物已经广泛在临床上得到应用 [1]。

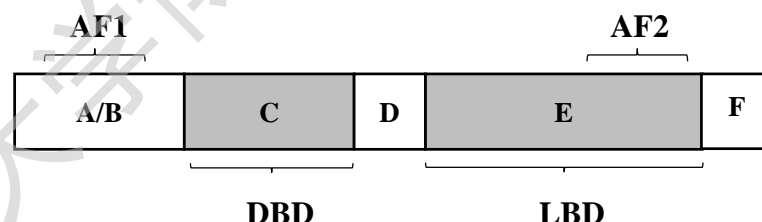


图 1 核受体的结构示意图

Figure. 1 The structure of Nuclear Receptors

结构上来讲，核受体主要分为 A/B, C, D, E 四个结构域（图 1）。这四个结构域各自有着不同的功能：N 段的 A/B 主要是配体非依赖的激活域，即它能够在没有配体的情况下发挥一部分转录激活的作用，此外，A/B 的 C 端部分能够调节与其他核受体的相互作用，从而影响核受体对 DNA 的结合作用。C 区主要负责与 DNA 序列结合，这部分非常保守，同时是各个核受体的特征序列，能够对核受体与其他核受体的相互作用产生影响。C 区包括 2 个锌指，叫做 P 盒与 C

盒区。结构域 D 是一段多变的, 可以弯曲的铰链区, 连接 C 与 E 两区域; 这部分常常带有 NLS, 并且可以让蛋白质的结构改变, 比如变得容易弯曲。结构域 E 是配体结合的结构域。另外, 这部分的作用非常广泛, 除了与配体结合之外, 它还能够和热休克蛋白结合、聚合, 从而介导着核受体的亚细胞定位、转录激活作用的调节、阻碍分子键作用等[1]。通常情况下, 核受体是先与自己或其他核受体组合成同源或异源二聚体, 然后小分子能够对这个二聚体产生抑制或者激活的作用, 从而调节对下游基因的转录活性[2]。

根据它们内源性配体, 可以将核受体归为 3 个类别, 他们分别是: 1) 非类固醇激素类的核受体: 包括 RAR (维甲酸的受体)、RXR(类视黄酸 X 受体)、TR (甲状腺激素受体) 与 VDR (维他命 D3 受体) 等; 2) 类固醇激素类的核受体: 包括 PR(孕激素)、MR(盐皮质激素)、ER(雌性激素受体)、GR(糖皮质激素)、和 AR(雄性激素受体) 等; 3) 未发现内源配体的孤儿核受体: 包括 Nur77、COUP-TF 等[3-5]。本篇文章就是针对核受体超家族中一个重要成员 Nur77 对于激活 TGF- β 信号通路的研究。

1.2 孤儿核受体 Nur77

Nur77 (TR3) 也叫做神经生长因子诱导的基因 B (NGFI-B), 还叫做 NR4A1, 它是一种孤儿核受体。到目前为止, 已经确认的人源的 NR4A 亚家族有 3 个成员: Nur77, Nurrl (也称为 NOT, NR4A2) [5] 和 Nor1 (NR4A3) [5-9]。作为立早基因的产物, 它们能够对多种信号产生响应, 他们参与的生物学过程包括细胞增殖, 分化, 凋亡, 自噬, 迁移, 代谢, 炎症和 DNA 修复等。这些亚型之间存在功能冗余 (特别是 Nur77 和 NR4A3), 并且它们的功能具有组织特异性[10-12]。然而, Nur77 最近也被报道能够进行非基因型的作用, 例如它能够出核然后靶向到线粒体, 将 Bcl-2 的作用由保护细胞变成杀死细胞[15,16]。

1.2.1 Nur77 的结构

Nur77 的结构特征是典型的核受体结构: 转录激活区域和保守的 DNA 结合结构域位于 N 端。在 C 端包含有结合配体的区域 (Ligand Binding Domain (LBD))。

在这两个主要功能区域之间还有一个可变量较高的铰链区。Nur77 依赖非常保守的 DNA 结合区域，以同源二聚体或者是单体的方式与对应的 DNA 序列 NBRE 相结合[13,14]。

1.2.2 Nur77 的分布

在表达方面，Nur77 首先是在神经细胞中被发现，接着科学家在 T 淋巴细胞和其他类细胞及组织中也发现 NUR77 的存在[17]，Nur77 在这些细胞及组织的生长发育过程中发挥着重要作用。之后的研究陆续发现，Nur77 在很多的器官组织上面都有表达，包括胸腺、肌肉、肺、肝、睾丸、腹部前列腺、肾上腺、甲状腺、脑垂体腺等许多组织，和 GR、RAR γ 比较起来，这个范围要更加广泛。

1.2.3 Nur77 的配体

Nur77 之所以被称为“孤儿”核受体是因为它的内源性配体还没有被发现。在它们的配体结合区域存在一些紧密堆积的疏水氨基酸，因此很难形成一个结合口袋让配体进入[13]。因此，孤儿受体的调节通常是配体非依赖性的，它们只通过表达水平以及转录后修饰进行调节，从而对下游基因产生影响。

然而近年来的研究也发现了 Nur77 的一些调节配体。最近的研究发现[18]，从内生菌 *Dothiorella* sp. HTF3 分离出来的 Csn-B (cytosporone B) 是 Nur77 的天然配体。Csn-B 结合到 Nur77- LBD 的特定区域，提高 Nur77 的转录激活活性，并使 Nur77 从细胞核内转向线粒体，引起细胞凋亡。Nur77 LBP 上的 Tyr451 在很多核受体中都是保守的，它在 Csn-B 与 Nur77 LBD 互作的过程中发挥着重要作用。Csn-B 与 Tyr451 结合，或者是 Csn-B 结合到 Nur77 LBP，引起 Nur77 构象发生一系列变化，从而影响 Nur77 的生物学活性。另外推测，Csn-B 头部的芳香族氨基酸的氢键及其尾部的烷基可能与 Nur77 LBD 表面的疏水残基相互作用。

1.2.4 Nur77 的表达调控

NR4A 被认为是一类立早基因是因为他们能够被众多信号上调，包括脂肪酸，压力，生长因子，细胞因子，激素，佛波醇，神经递质以及一些物理刺激（如磁场和声音）。这种能够感知和快速反应环境变化的能力被看作是 NR4A 家族的标

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.